

Identifikasi Protein Hemagglutinin Pili *Proteus Mirabilis* P 355

Diana Chusna Mufida

Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Jember

Abstract

Urinary tract infection represent one of nosocomial infection in hospital. One of agent nosocomial urinary tract infection is *Proteus mirabilis* and common occurs on patient with urinary catheter. Urinary tract infection in with caused by *Proteus mirabilis* was persistent, very difficult to eradicated. Futher more it caused some complication such as cystitis, acute and chronic pyelonephritis, kidney bladder stone, bacteremia and sepsis. This bacterium has same virulence factors. Fimbriae is one of it.

The purpose of this research is to identify hemagglutinin protein of *Proteus mirabilis* P355 pili. In this study protein of pili was isolated, and than continued with the hemagglutination test.

The result of this study shown that hemagglutination test was positive in protein pili with 35,2 kDa, 27,9 kDa, 24 kDa and 22 kDa molecular weight. The highest titer of hemagglutination (1/512) wa found on protein pili with 35,2 kDa molecular weight .

Keywords : hemagglutinin, *Proteus mirabilis*, pili

Pendahuluan

Infeksi saluran kemih merupakan salah satu infeksi nosokomial yang paling sering terjadi. Penyebab infeksi saluran kemih yang didapat di rumah sakit ini sebagian besar adalah *E. coli*, kemudian diikuti oleh *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* dan *Enterococcus*. Tetapi pada pasien yang menggunakan kateter *Proteus mirabilis* merupakan penyebab tersering dari ISK.¹

Proteus mirabilis termasuk dalam tribe Proteae, famili Enterobacteriaceae. Bakteri ini sering ditemukan di tanah dan air serta merupakan flora normal pada saluran pencernaan manusia dan mamalia.² Bakteri ini memiliki karakteristik batang, gram negatif, mempunyai kemampuan *swarming* pada medium agar.³ *Proteus mirabilis* merupakan salah satu penyebab

terpenting infeksi saluran kemih, karena infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini bersifat persisten, sulit diterapi dan dapat berakibat fatal. Bakteri ini dapat menimbulkan komplikasi antara lain pyelonephritis akut dan kronik, cystitis, serta pembentukan batu di ginjal dan vesica urinaria, bakteremia dan sepsis.^{2,4} *Proteus mirabilis* mempunyai beberapa faktor virulensi, yaitu fimbria atau pili, hemolisin, flagella, immunoglobulin A protease, deaminase serta urease.

Untuk dapat menyebabkan infeksi, mikroorganisme melibatkan beberapa tahap, yaitu dimulai dengan pelekatan/adhesi pada permukaan sel inang, dan selanjutnya dapat terjadi invasi dan menyebar secara lokal atau sistemik. Kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang diperantai oleh molekul adhesi yang terdapat pada bakteri dan reseptor yang terdapat pada sel inang. Molekul adhesi pada bakteri

bisa terletak di pili atau di *outer membrane protein* (OMP). Pelekatan bakteri ke sel inang ini bersifat spesifik. Spesifitas ini berhubungan dengan ketersediaan reseptor yang sesuai dan hal ini akan menentukan bagian tubuh yang akan diinfeksi oleh bakteri.⁵

Karakteristik molekul adhesi diketahui melalui adanya kemampuan untuk menggumpalkan sel darah merah. Protein hemagglutinin menggumpalkan sel darah merah digolongkan menjadi dua yaitu *mannose sensitive hemagglutinin* (MSHA) dan *mannose resistant hemagglutinin* (MRHA). Protein hemagglutinin pada *outer membrane protein Vibrio cholera 01 classical* (OMP) yang mempunyai berat molekul 38 kDa dan merupakan molekul adhesi.⁶ Protein hemagglutinin *Vibrio cholerae 01 M094V* mempunyai berat molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,9 kDa dan 21,3 kDa berasal dari pili dan dari *outer membrane protein* mempunyai berat molekul 37,8 kDa dan protein hemagglutinin tersebut juga merupakan protein adhesin.⁷ Oleh sebab itu utama penelitian ini adalah melakukan identifikasi protein hemagglutinas *Proteus mirabilis*.

Metodologi

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratorium yang bertujuan mengidentifikasi protein hemagglutinin pili *Proteus mirabilis* P335.

Bahan-bahan yang digunakan adalah media *broth heart infusion* (BHI), TCG, gel acrilamid 12%, running buffer, staining, destaining, PBS steril, EDTA. Alat yang dipakai yaitu omnimixer, seperangkat alat elektroferesis, seperangkat alat dialisis, pipet V dengan 96 sumuran.

Bakteri *Proteus mirabilis* diambil dari pasien infeksi saluran kemih di

Rumah Sakit Saiful Anwar Malang dan diidentifikasi dengan metode *Microbact*. Bakteri yang akan dilakukan penelitian ditumbuhkan pada media BHI selama 24 jam.

Metode kultur *Proteus mirabilis*

Bakteri yang akan digunakan adalah *Proteus mirabilis* galur lokal yang berasal dari urin pasien bakteriuria, Metode yang digunakan menurut petunjuk Ehara yaitu media TCG yang memperkaya pertumbuhan pili *Proteus mirabilis*. Media ini mengandung 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO₃, 0,15 bactotryptonr, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan 1mM EGTA. Media agar dibuat dalam botol kapasitas 250 ml secara miring sebanyak 50 ml agar. *Proteus mirabilis* yang dipilih ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Kemudian suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam setiap botol yang mengandung media TCG. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam.⁸

Metode Isolasi Pili *Proteus mirabilis*

Pili dipanen dari 50 botol biakan bakteri. Hasil koleksi bakteri ditambahkan tri klor acetat acid (TCA) sampai konsentrasi 3%. Setelah dikocok rata diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dan tiap 15 menit di kocok. Selanjutnya disentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1 : 10. Bakteri dicukur dengan menggunakan mixer sendiri. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama 1 menit, diulang sampai 5 kali dengan masa istirahat 1 menit. Hasilnya dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan

kecepatan 12000 rpm suhu 4°C, Pili yang terletak dibagian atas diambil. Endapan disuspensi dengan larutan dan cara yang sama seperti di atas dan dikumpulkan dengan cara mencukur ulang sampai beberapa kali, sampai dihasilkan supernatant yang menunjukkan tes aglutinasi negatif.⁷

Metode Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE. Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5mM Tris HCl pH 6,8, 2- mercapto ethanol 5%, w/v sodium dodecyl sulfate 2,5%, v/v gliserol 10% dengan warna pelacak bromophenol blue. Dipilih mini slab gel 12,5% dengan tracking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Bahan yang digunakan adalah cromasive brilliant blue dan molekul standart *sigma low range marker*.⁹

Metode Pemurnian Protein Hemaglutinin Pili *Proteus mirabilis*

Metode yang dilakukan seperti yang telah dikerjakan oleh Ehara dengan modifikasi. Hasil SDS-PAGE koleksi pili gel, gelnya dipotong lurus pada bobot molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan dalam membran dialisis memakai cairan penyangga elektroforesis, running buffer. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis frontal apparatus aliran 125 mv selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan dialisis dengan cairan penyangga PBS pH 7,4 selama 2x24 jam @ 1 liter dan diganti 2 kali. Cairan dialisis tersebut dilakukan uji hemaglutinasi.⁷

Uji hemaglutinasi dikerjakan menurut petunjuk dari Li. Pengenceran sampel dibuat konsentrasi 1/2 pada mikrolat V, dimana tiap sumur volumenya 50 µl. Tiap sumur ditambahkan suspensi darah merah mencit konsentrasi 0,5% volume sama. Kemudian digoyang dengan rotator plate selama 1 menit. Selanjutnya diletakkan dalam suhu kamar selama 1 jam. Besarnya titer ditentukan dengan pengamatan adanya agglutinasi darah merah pada pengenceran yang terendah. Sampel yang diuji adalah *crude* pili dan protein pili *Proteus mirabilis*. Darah yang dipakai adalah darah mencit.¹⁰

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Proteus mirabilis P355 diambil dari pasien infeksi saluran kemih di Rumah Sakit Syaiful Anwar dibiakkan pada media Mac Conkey, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah itu bakteri dipindahkan ke media Brain Heart Infusion (BHI) kemudian dibiakkan lagi ke media TCG dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Bakteri *Proteus mirabilis* P355 yang sudah diperbanyak pada media TCG dipanen dan dilakukan pemotongan pili sebanyak 4 kali.

Uji Hemaglutinasi

Selanjutnya potongan pili tersebut dilakukan uji hemaglutinasi, untuk melihat pili potongan yang mana yang mengandung protein hemaglutinin. Hasil uji hemaglutinasi terdapat pada tabel 1.

Hasil uji hemaglutinasi ini menunjukkan bahwa pada potongan pili yang ke-2 menunjukkan titer tertinggi yaitu 1/16. Selanjutnya potongan pili dilakukan SDS-PAGE

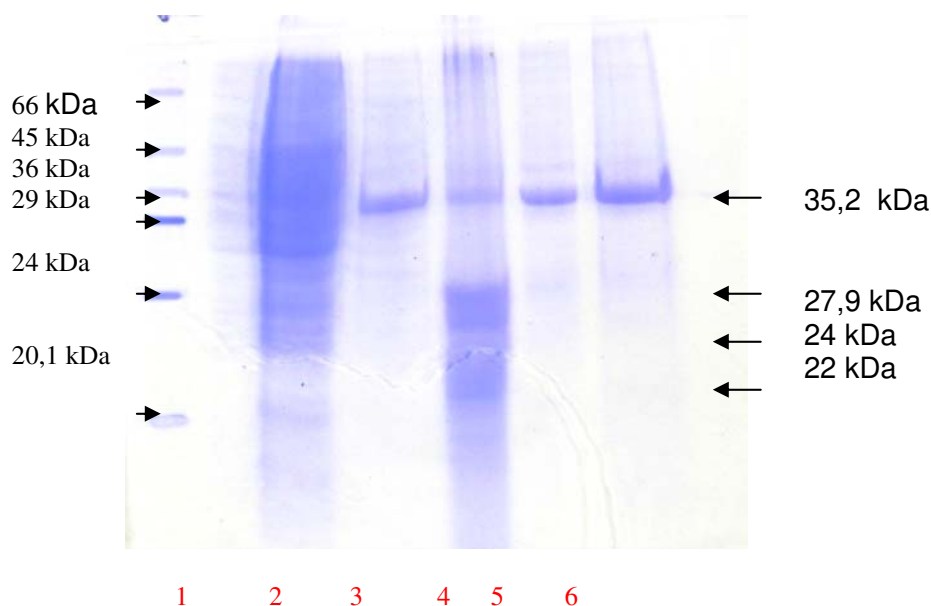
untuk memprediksi berat molekul gambar 1.
protein, dengan hasil seperti pada

Tabel 1. Uji hemaglutinasi pili *Proteus mirabilis* P355
pada eritrosit mencit

Materi	Pengenceran									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
P1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

1. P1 : pili potongan pertama
2. P2 : pili potongan kedua
3. P3 : pili potongan ketiga
4. P4 : pili potongan keempat



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE whole cell dan potongan pili
Proteus mirabilis P355.

Keterangan :

- Sumur 1 : protein perunut
Sumur 2 : whole cell

Sumur 3: potongan pili 1

Sumur 4: potongan pili 2

Sumur 5: potongan pili 3

Sumur 6: potongan pili 4

Tabel 2. Hasil uji hemaglutinasi protein pili *Proteus mirabilis* P355 dengan menggunakan eritrosit mencit.

Berat molekul protein (kDa)	Pengenceran									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
35,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
27,9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Profil protein pada SDS-PAGE dari beberapa potongan pili *Proteus mirabilis* P355 menunjukkan protein yang menonjol yaitu protein dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa, 24kDa dan 22 kDa. Selanjutnya protein yang menonjol tersebut dipotong dan dilakukan elektroelusi dan dialisis, sehingga diperoleh protein larutan. Dari hasil elektro elusi dan dialisis protein pili tersebut dilakukan uji hemaglutinasi pada eritrosit mencit, dengan hasil seperti pada tabel 2.

Dari tabel terlihat bahwa pada protein dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa, 24 kDa dan 22 kDa mampu menghemaglutinasi eritrosit mencit dan merupakan protein hemaglutinin. Tetapi titer hemaglutinasi tertinggi ditunjukkan oleh protein pili dengan berat molekul 35,2 kDa.

Pembahasan

Untuk menentukan adanya protein hemaglutinin, langkah awal dari penelitian ini adalah pemisahan fraksi pili dengan menggunakan mixer buatan sendiri dengan memotong pili secara bertingkat. Selanjutnya dilakukan uji hemaglutinasi dari potongan pili tersebut dengan sel darah merah mencit,

dan diperoleh titer pada potongan pertama 1/8 pemotongan pili kedua 1/16, pemotongan pili ketiga dengan titer 1/2 dan pemotongan pili keempat tidak terjadi aglutinasi, seperti tampak pada tabel 1.

Selanjutnya untuk mengetahui berat molekul dari fraksi pili, dilakukan SDS-PAGE, seperti tampak pada gambar 1, dimana pada lajur kedua terdapat satu pita protein, sedangkan pada lajur berikutnya terdapat lebih dari satu pita protein. Hasil perhitungan berat molekul, pada lajur kedua (potongan pili pertama) mempunyai berat molekul 35,2 kDa. Pada lajur ketiga (potongan pili kedua) berat molekul fraksinasi pili adalah 35,2 kDa 27,9 kDa 24kDa dan 22kDa. Fraksinasi dari potongan pili kedua dimurnikan dengan memotong pita protein tersebut dan dilakukan elektroelusi dan dialisis, kemudian dilakukan uji hemagutnasi dengan menggunakan eritrosit mencit, dengan hasil seperti pada tabel 2. Dari tabel tersebut tampak bahwa semua fraksi protein pili memberikan hasil uji hamaglutinasi yang positif, maka protein dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa, 24kDa dan 22kDa disebut dengan protein hemaglutinin. Dari uji hemaglutinasi ini dapat menjawab

masalah penelitian, bahwa *Proteus mirabilis* mempunyai protein hemagglutinin pili dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa, 24kDa dan 22kDa.

Kemampuan pili dalam menggumpalkan sel darah merah ada dua tipe, yaitu *mannose sensitive hemagglutinin* (MSHA) dan *mannose resistant hemagglutinin* (MRHA). MRHA akan berubah menjadi MSHA apabila sel darah merah diberi asam tannat 0,01%. Penelitian yang dilakukan oleh Sareneva menunjukkan bahwa *Proteus mirabilis* mempunyai pili yang bersifat manosa resisten (MR/P) dengan berat molekul 21 kDa.¹¹ Pada penelitian kami didapatkan protein hemagglutinin pili dengan berat molekul 22 kDa. Kemungkinan protein hemagglutinin dengan berat molekul 22 kDa tersebut, sama dengan MR/P yang ditemukan oleh Sareneva dengan berat molekul 21 kDa.¹¹ Namun hal ini perlu pembuktian lebih lanjut. *Proteus mirabilis* juga mempunyai protein hemagglutinin pili yang hanya mampu mengaglutinasi eritrosit, setelah diberi asam tannat, dan disebut dengan MR/K. Subunit pili ini mempunyai berat molekul 19,5 kDa.¹² Sedangkan protein hemagglutinin dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa dan 24 kDa, belum ada yang melaporkan.

Simpulan dan Saran

Proteus mirabilis mempunyai molekul hemagglutinin pili dengan berat 35,2 kDa, 27,9 kDa dan 24 kDa. Dari hasil meneliti ini diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai sifat molekul hemagglutinin merupakan molekul hemagglutinin manosa resisten atau manosa sentitif serta kemampuannya melakukan adhesi. Disamping itu perlu dilakukan identifikasi N-asam amino terminal dan gen penyandinya.

Daftar Pustaka

1. Gales CA, Jones NR, Gordon AK, Sader SH, Wilke WW, Beach LM, Pfaller AM, Doern VG. Activity and Spectrum of 22 Antimicrobial Agent Tested Against Urinary Tract Infection Pathogens in Hospitalized patient in Latin America: report from the second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 45 : 295-303.
2. Wassif C, Cheek D, Belas R. Molecular Analysis of a Metalloprotease from *Proteus mirabilis*. *Journal of Bacteriology* 1995; 177 : 5790-5798.
3. Pfaller MA., Mujeib I, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV. Evaluation of the Discriminatory Powers of Dienes Test and Ribotyping Methods for *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 36 : 1077-1080.
4. Perepelov, Ujazda E, Senchenkova NS, Shashkov A., Kaca W. Structural and serological studies on the O-antigen of *Proteus mirabilis* O14, a new polysaccharide containing 2-[(R)-1-carboxyethylamino] ethyl phosphate. *European Journal of Biochemistry* 1999; 261: 347-353.
5. Salyers AA, Whitt D. *Bacterial Pathogenesis: bacterial strategies for invading or surviving the defense systems of the human body*. 2th ed. Washington DC: ASM Press 2002; 115-127.
6. Sperandio V, Giron JA, Siveira WD, Kaper JB. The *Omp U* membrane protein, potential adherence factor of *Vibrio Cholera*. *Infect Immun* 1995; 63: 4433-4438.
7. Sumarno. *Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi Vibrio cholerae 01 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih, Studi Patogenitas V. cholerae 01 M094V*. Surabaya: Universitas Airlangga, 2000: 95, Disertasi .

8. Ehara, M., Ishibashi, M., Ichinose, Y., Iwanaga, M., Schimotori, S., Naito, T., 1986. Purification and Partial Characterisation of Fimbriae of *Vibrio cholera* 0-1. Vaccine; 5: 283-286.
9. Smeds A, Hemmann K, Jakava-Viljanen M, Pelkonen S, Imberechts H, Palva A. Characterization of the Adhesin of *Escherichia coli* F18 Fimbriae. Infection and Immunity 2001; 69 : 7941-7945
10. Li Xin, Johnson ED, Mobley TLH. Requirement of MrpH for Mannosa-Resistant *Proteus* Like fimbriae Mediated Hemagglutination by *Proteus mirabilis*, Infection and Immunity 1999; 67: 2822-2833.
11. Sareneva T, Holtthofer H, Cotran RS. Tissue binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. Infect and Immunity. 1990; 58: 3330-3336.
12. Rozalski, A, Sidorczyk, Z, Kotelko K. Potential Virulence Factors of *Proteus bacilli*. Microbiology and Molecular Biology Review 1997; 61: 65-89.

